

作,取得病理诊断依据,以尽早明确诊断。

### 参 考 文 献

- [1] 叶艳平,何悦明,冯向东,等. 第 116 例——咳嗽、咳痰、纵隔淋巴结肿大、双肺弥漫性结节影. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(12):951-954.
- [2] 宋晓东,黄晓磊,徐齐峰,等. 肉芽肿性血管炎兼结核潜伏感染者一例. 结核病与肺部健康杂志, 2015, 4(3):196-199.
- [3] 葛均波,徐永健. 内科学. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2014:93.
- [4] 陈灏珠,林果为. 实用内科学. 13 版. 北京:人民卫生出版社,

2009:1845.

- [5] Nakhla H, Jumbelic MI. Sudden death of a patient with pulmonary Langerhans cell histiocytosis. Arch Pathol Lab Med, 2005, 129(6):798-799.
- [6] 蔡柏蔷,肖毅. 当代呼吸病学进展. 北京:中国协和医科大学出版社,2008:329-333.
- [7] 李业梅,俞小卫,杨明夏,等. 成人朗格汉斯细胞组织细胞增多症二例. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(4): 311-313.

(收稿日期:2016-05-19)

(本文编辑:李敬文)

## · 短篇论著 ·

# RNA 恒温扩增实时荧光检测技术对涂阴肺结核患者 支气管肺泡灌洗液检测的价值

秦志华 施军卫 邱青 陈晓丽 郑宏 瞿梅 唐健美

**【摘要】** 临床上无痰或涂阴疑似肺结核患者占肺结核患者的绝大多数,因结核分枝杆菌抗酸染色涂片镜检(简称“涂片法”)阳性率低、培养法耗时较长,均不能满足临床对肺结核快速诊断的需求。本研究收集 2014 年 1 月至 2016 年 5 月在江苏省南通市第六人民医院入院的 223 例疑似涂阴肺结核患者的支气管肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF),分别进行涂片法、BACTEC MGIT 960 快速液体培养(简称“MGIT 960”)及 RNA 恒温扩增实时荧光(simultaneous amplification and testing for *Mycobacterium tuberculosis*, SAT-TB)检测。结果显示, MGIT 960 培养法和 SAT-TB 检测的阳性率分别为 27.04%(43/159)和 32.70%(52/159),均明显高于痰涂片的 2.52%(4/159),差异均有统计学意义( $\chi^2$  值分别为 37.97 和 49.94,  $P$  值均  $<0.001$ )。SAT-TB 与 MGIT 960 培养法阳性率比较差异无统计学意义( $\chi^2=1.22$ ,  $P=0.270$ )。若以 MGIT 960 培养法阳性为诊断标准, SAT-TB 诊断涂阴肺结核的敏感度为 86.05%(37/43),特异度为 98.15%(53/54);阳性预测值为 97.37%(37/38),阴性预测值 89.83%(53/59)。但 SAT-TB 检测完成时间(1~2 h)明显短于 MGIT 960 培养法(2~6 周)。因此,对疑似涂阴肺结核患者的 BALF 采用 SAT-TB 检测有较大的早期快速诊断价值。

**【关键词】** 结核,肺; 支气管肺泡灌洗液; 核酸扩增技术; 诊断技术和方法; 评价研究

**Evaluation of simultaneous amplification and testing in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of patients with smear-negative pulmonary tuberculosis** QIN Zhi-hua, SHI Jun-wei, QIU Qing, CHEN Xiao-li, ZHENG Hong, QU Mei, TANG Jian-mei. Tuberculosis Diagnosis and Treatment Center, the Sixth People's Hospital of Nantong City, Jiangsu Province, Nantong 226011, China  
Corresponding author: SHI Jun-wei, Email: jsntsjw\_62@163.com

**【Abstract】** In clinical practice, many patients suspected of having pulmonary tuberculosis (TB) are difficult to be determined as TB due to lack of bacteriological evidence by using the routine laboratory examination methods, such as sputum smear microscopy with low positive rate and sputum culture with a long time getting results. Those methods cannot meet the clinical needs. A total of 223 cases with smear-negative results but suspected of having pulmonary TB, and hospitalized at our hospital from January 2014 to May 2016, were recruited in this study. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected from those patients and the following examinations were performed on all BALF, including smear microscopy, MGIT 960 rapid culture and simultaneous amplification and tes-

ting for *mycobacterium tuberculosis* (SAT-TB). The results showed that the positive rates of MGIT960 rapid culture and SAT-TB were 27.04% (43/159) and 32.70% (52/159) respectively, they were all significantly higher than that of smear method (2.52%, 4/159), and those differences were statistically significant ( $\chi^2=37.97$  and  $49.94$  respectively,  $P<0.001$ ); but the positive rate was no statistically difference between SAT-TB and MGIT 960 culture method ( $\chi^2=1.22$ ,  $P=0.270$ ). If MGIT 960 culture was considered as the gold standard method, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of SAT-TB was 86.05% (37/43), 98.15% (53/54), 97.37% (37/38) and 89.83% (53/59) respectively. However, compared with MGIT 960 rapid culture method, it takes significantly shorter time getting the results by using SAT-TB (1–2 hours vs. 2–6 weeks). Therefore, there is a great value in early or rapid diagnosis of the pulmonary TB patients with smear-negative results by performing SAT-TB in BALF.

**【Key words】** Tuberculosis, pulmonary; Bronchoalveolar lavage fluid; Nucleic acid amplification techniques; Diagnostic techniques and procedures; Evaluation studies

我国是世界上 22 个结核病高负担国家之一, 尽管世界卫生组织《2015 年全球结核病报告》显示我国发病患者国际排名首次由第二位下降至第三位, 但是每年仍有 93 万例患者发病, 结核病防控的道路依然漫长和艰辛<sup>[1]</sup>。早诊断、早治疗是防控结核病的关键, 涂片抗酸杆菌染色镜检(简称“涂片法”)或培养法检测结核分枝杆菌是诊断的金标准, 但是, 涂片法找抗酸杆菌阳性率低, 只有 10%~30%, 特异度不高<sup>[2]</sup>; 培养法耗时长, 即使 BACTEC MGIT 960 快速液体培养法(简称“MGIT960”)也需要 2~6 周时间; RNA 恒温扩增实时荧光(simultaneous amplification and testing for *Mycobacterium tuberculosis*, SAT-TB)检测技术是近年来兴起的通过检测标本中结核分枝杆菌 RNA 诊断结核病的一种新方法, 国内外众多研究发现该方法检测痰标本具有很高的敏感度及特异度<sup>[3-4]</sup>。但影响痰标本采集及检测结果的因素较多, 尤其对于无痰或涂阴肺结核患者无法进行检测及诊断, 本研究通过 SAT-TB 法检测支气管肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF)中的结核分枝杆菌核糖核酸(RNA), 初步分析 SAT-TB 法对无痰或涂阴肺结核患者的诊断价值。

## 对象和方法

### 一、研究对象

1. 一般情况: 将江苏省南通市第六人民医院 2014 年 1 月至 2016 年 5 月入院的 223 例疑似涂阴肺结核患者作为研究对象。所有涂阴疑似肺结核患者入院前经门诊痰涂片检查结果为阴性(不一定查三次), 入院后再给予痰涂片、MGIT 960 痰培养、痰脱落细胞、结核菌素试验(purified protein derivative test, PPD 试验)、结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT, TB), 以及支气管镜刷检涂片找抗酸杆菌及癌细胞和支气管肺泡灌洗液行涂片法、MGIT 960 培养、SAT-TB 检测、普通细菌培养及脱落细胞检查, 血清抗结核抗体、血清肿瘤指标等检查; 同时进行诊断性抗结核药物治疗。剔除入院后 3 次痰涂片阳性患者 10 例, 实际入组 213 例。同期记录患者的一般资料, 包括姓名、性别、年龄、诊断结果、相关实验室检查及影像学表现等结果。其中男 145 例(68.1%), 女 68 例(31.9%), 年龄 14~72 岁, 平均年龄(36.9±14.7)岁。所有患者均签署知情同意书并同意行支气管镜检查。所有

患者都追踪观察 6 个月以上确保诊断的正确。

2. 入组条件: (1)因症就诊或体检时发现肺部异常阴影, 高度疑似肺结核者; (2)连续 3 次痰涂片抗酸染色检查阴性者; (3)签字同意行电子支气管镜检查。

3. 分组情况: 223 例患者实际入组 213 例。其中临床诊断肺结核患者(肺结核组)159 例, 年龄 14~70 岁, 平均年龄(32.5±13.8)岁; 非肺结核患者(非肺结核组)54 例, 年龄 35~72 岁, 平均年龄(41.1±15.6)岁, 其中细菌性肺炎 18 例、支气管肺癌 13 例、支气管扩张症 9 例、肺大疱并发感染 6 例、肺脓肿 5 例、慢性阻塞性肺疾病 2 例、隐源性机化性肺炎 1 例。

### 二、方法

1. 涂阴肺结核的诊断标准<sup>[5]</sup>: 凡符合下列条件之一者为临床诊断患者(涂阴肺结核)。(1)3 次痰涂片阴性, 胸部影像学检查显示与活动性肺结核相符的病变且伴有咳嗽、咯痰、咯血等肺结核可疑症状。(2)3 次痰涂片阴性, 胸部影像学检查显示与活动性肺结核相符的病变且 PPD 试验结果为强阳性。(3)3 次痰涂片阴性, 胸部影像学检查显示与活动性肺结核相符的病变且抗结核抗体检查阳性。(4)3 次痰涂片阴性, 胸部影像学检查显示与活动性肺结核相符的病变且肺外组织(如淋巴结)病理检查证实为结核病变者。(5)3 次痰涂片阴性的疑似肺结核患者经诊断性抗结核药物治疗或随访观察可排除其他肺部疾病者。

2. 非结核性肺部疾病的诊断: 不符合以上涂阴肺结核的诊断标准, 参照《内科学》第 7 版呼吸系统疾病章节<sup>[6]</sup>临床诊断为其他肺部疾病, 且经经验性治疗效果良好的患者。

3. BALF 收集方法: 采用日本 Pantax 电子支气管镜对患者进行检查, 在患者胸部 CT 或胸部 X 线摄影检查显示病灶相应的支气管肺段注入 0.9%氯化钠 10~20 ml 进行支气管肺泡灌洗, 通过负压吸引器回收 BALF 8~15 ml 至无菌瓶内, 并送检验科行涂片、SAT-TB 及 MGIT 960 检查。

4. SAT-TB 检测试剂盒(批号为: 20130407)购自中国上海仁度生物科技有限公司, 根据试剂盒说明书进行操作, 但 BALF 的前期处理与痰标本略有不同, 对含有黏液的 BALF 标本适当加入 4%氢氧化钠进行液化, 最多不超过标本量的 1 倍体积。

5. 痰涂片及培养操作: 严格按照张贺秋、赵雁林主编的

《现代结核病诊断技术》第三章结核病实验室诊断中的检验规程执行<sup>[7]</sup>。

6. 结核分枝杆菌快速液体培养用 BACTEC MGIT 960 分析仪、BACTEC MGIT 试剂盒(批号为:20110623)均购自碧迪医疗器械上海有限公司。

### 三、统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学分析,对 BALF 采用涂片法、MGIT 960 培养法及 SAT-TB 三种不同检测方法检测阳性率的比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、SAT-TB 与涂片法、MGIT 960 培养法检测结果的比较

在对 159 例涂阴肺结核患者的 BALF 检测中, MGIT 960 培养法和 SAT-TB 检测的阳性率分别为 27.04% 和 32.70%, 均明显高于涂片法阳性率(2.52%), 差异均有统计学意义( $\chi^2 = 37.97$  和  $49.94$ ,  $P$  值均  $< 0.001$ )。SAT-TB 与 MGIT 960 培养法阳性率比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.22$ ,  $P = 0.270$ ), 但 SAT-TB 检测完成时间(1~2 h)明显短于 MGIT 960 培养法(2~6 周)。具体见表 1。

### 二、SAT-TB 检测 BALF 对诊断涂阴肺结核的价值

1. SAT-TB 与 MGIT960 培养法(判断标准)对 213 例涂阴肺结核患者的 BALF 检测结果分析:在确诊肺结核组中(43 例 MGIT 960 培养阳性的患者),经 SAT-TB 检测阳性者 37 例,阴性者 6 例;而 54 例非肺结核患者中, SAT-TB 阳

性 1 例。若以 MGIT 960 培养法阳性为诊断标准,非肺结核组患者作为阴性标准, SAT-TB 诊断肺结核的敏感度为 86.05%(37/43), 特异度为 98.15%(53/54); 阳性预测值为 97.37%(37/38), 阴性预测值 89.83%(53/59) [注 敏感度 = 真阳性/(真阳性+假阴性)  $\times 100\%$ , 特异度 = 真阴性/(假阳性+真阴性)  $\times 100\%$ , 阳性预测值 = 真阳性/(真阳性+假阳性)  $\times 100\%$ , 阴性预测值 = 真阴性/(真阳性+假阴性)  $\times 100\%$ ], 具体见表 2。

2. SAT-TB 与临床诊断对 213 例涂阴肺结核患者的 BALF 检测结果分析:若以临床诊断作为判断肺结核的阳性标准,临床诊断肺结核包括培阳及培阴肺结核,非肺结核组患者为阴性标准, SAT-TB 诊断涂阴肺结核的敏感度为 32.70%(52/159), 特异度为 98.15%(53/54)。阳性预测值为 98.11%(52/53), 阴性预测值 33.13%(53/160)。见表 3。

## 讨 论

SAT-TB 技术是以结核分枝杆菌特异的 16S rRNA 为靶标,通过恒温 RNA 扩增技术,将荧光标记的探针与靶标片段的扩增产物杂交后释放出荧光信号,对荧光信号进行实时检测,从而快速准确地判断标本中是否有结核分枝杆菌存在<sup>[8]</sup>。已有的研究发现对临床诊断肺结核患者的痰标本中 SAT-TB 检测的阳性率为 40.0%~68.4%,如以培养阳性作为诊断肺结核的金标准, SAT-TB 的敏感度为 81.0%~97.8%, 特异度为 84.2%~100.0%<sup>[3-4,9]</sup>。提示 SAT-TB 检测的阳性率明显高于涂片法(仅 10%~30%),与培养法有很高的符合率。因此与涂片法及培养法比较, SAT-TB 检测技术具有快速、高敏感度和高特异度的优势。但是这些研究

表 1 不同检测方法对 159 例涂阴肺结核患者的 BALF 进行检测的阳性率比较

检测方法	阳性(例)	阴性(例)	阳性率(%)	检测完成时间
涂片法	4	155	2.52	1 h
MGIT 960 培养法	43	116	27.04 <sup>a</sup>	2~6 周
SAT-TB 法	52	107	32.70 <sup>b,c</sup>	1~2 h

注 <sup>a</sup>:与涂片法比较,  $\chi^2 = 37.97$ ,  $P < 0.001$ ; <sup>b</sup>:与涂片法比较,  $\chi^2 = 49.94$ ,  $P < 0.001$ ; <sup>c</sup>:与 MGIT 960 培养法比较,  $\chi^2 = 1.22$ ,  $P = 0.270$

表 2 SAT-TB 与 MGIT960 培养法对 213 例涂阴肺结核患者的 BALF 检测结果(例)

SAT-TB 检测	MGIT 960 培养法		非肺结核	合计
	阳性	阴性		
阳性	37	15	1	53
阴性	6	101	53	160
合计	43	116	54	213

表 3 SAT-TB 与临床诊断对 213 例涂阴肺结核患者的 BALF 检测结果(例)

SAT-TB 检测	临床诊断		非肺结核	合计
	培养阳性	培养阴性		
阳性	37	15	1	53
阴性	6	101	53	160
合计	43	116	54	213

都集中在对痰标本的检测中<sup>[3-4,9-11]</sup>,对于无痰或涂阴肺结核患者无法进行检测,而临床上有很多这样的患者。笔者通过对这些患者进行支气管镜检查,收集支气管肺泡灌洗液进行 SAT-TB 检测,发现对无痰或涂阴肺结核的早期快速诊断同样有很大的帮助。

本研究对 159 例临床诊断的涂阴肺结核患者的 BALF 采用 SAT-TB 和 MGIT 960 培养法检测,结果显示检测的阳性率分别为 32.70% 和 27.04%,均明显高于涂片法的 2.52%。SAT-TB 法阳性率稍高于 MGIT 960 培养法,并且 MGIT 960 培养法耗时长,需要 2~6 周时间,而 SAT-TB 法检测时间仅需 2 h 左右,说明应用 SAT-TB 法检测 BALF 有利于早期快速诊断涂阴肺结核。

本研究结果显示,若以 MGIT 960 培养法阳性作为诊断肺结核的标准,非肺结核组患者作为阴性标准,SAT-TB 诊断肺结核的敏感度为 86.05%,说明 SAT-TB 法检测 BALF 可以提供较高的诊断敏感度。但是,在 43 例培养阳性标本中有 6 例 SAT-TB 阴性,说明也产生了假阴性结果,可能是因为 RNA 在环境中降解较快,标本放置时间长,而不能检出,但有待进一步研究。无论是以培养阳性还是临床诊断作为判断肺结核的标准,SAT-TB 的阳性预测值及特异度均达到 98% 左右,提示该方法诊断肺结核具有高度准确性。在 54 例非肺结核患者中,有 1 例 SAT-TB 检测阳性,提示为假阳性,可能是在 BALF 分装送检过程中或支气管镜消毒不严等造成污染所致。这也提醒我们,尽管 RNA 在环境中极易降解,可有效避免污染,但在内镜消毒、BALF 的留取过程、标本分装及送检、实验室操作环节中仍有出现标本污染可能<sup>[9]</sup>,在临床操作中,应严格各项操作规范,避免人为因素而出现假阳性。

据文献报道,SAT-TB 检测 BALF 的阳性率高于痰标本<sup>[12]</sup>,但本研究结果显示在涂阴肺结核 SAT-TB 检测 BALF 的总检出率为 32.70%,低于文献报道的痰标本 SAT-TB 检出率(40.0%~68.4%)<sup>[3-4,9]</sup>,也稍低于任斐等<sup>[8]</sup>和范琳等<sup>[12]</sup>对 BALF 进行 SAT-TB 检测的检出率(40.0%~53.7%)。原因可能是:(1)入组部分患者肺部病灶表现不典型,只有少许斑片及结节影,病灶中结核分枝杆菌菌量少,排出细菌量较低;(2)支气管镜操作医师对肺部病变所对应支气管肺段定位不够准确,收集的 BALF 液体量偏少或混有血液;(3)所取标本放置时间较长,有时 BALF 收集后送到检验科要经过 3~4 h,由于开始引进 SAT-TB 技术时标本量少,检验科检验技师兼做其他项目,每周只集中做 1~2 次,所以有时标本还要在冰箱中存放 3~5 d 才检测,导致检出率降

低。但这不影响 SAT-TB 用于 BALF 检测的诊断价值,尤其对于干咳少痰或无痰的患者。这是以后我们工作及研究中要高度重视的问题,尤其在患者选择、胸部 CT 准确定位病灶、及时送检、及时检测等方面加以改进,有望进一步提高其检测阳性率。同时也应意识到,由于痰液及 BALF 标本的收集检测有许多影响因素,二者检测阳性率的比较,应该在同一组患者中同时检测痰液及 BALF 才更可靠,也为我们今后的研究提供了方向。

综上所述,SAT-TB 法检测 BALF 诊断涂阴肺结核的特异度、敏感度明显高于涂片法,与 MGIT 960 培养法相近,且检测时间短,对涂阴尤其无痰肺结核患者的早期快速准确诊断有一定价值。

## 参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva: World Health Organization, 2015; 1-30.
- [2] 杨虹, 苏琪, 金胺“O”-罗丹明(B)法与萋尼法在抗酸杆菌涂片镜检中的比较. 现代检验医学杂志, 2007, 22(2): 106-107.
- [3] 张娟, 孙炳奇, 王悦, 等. RNA 恒温扩增实时检测技术在肺结核诊断中的价值. 实用医学杂志, 2013, 29(17): 2893-2895.
- [4] 倪丽丽, 罗柳林, 景玲杰, 等. 恒温扩增实时荧光检测技术在肺结核诊断中的临床价值. 中华检验医学杂志, 2012, 35(8): 702-705.
- [5] 薛晓, 马艳, 刘二勇, 等. 涂阴肺结核患者的诊断与治疗研究进展. 中国防痨杂志, 2015, 37(5): 526-530.
- [6] 陆再英, 钟南山. 内科学. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [7] 张贺秋, 赵雁林. 现代结核病诊断技术. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 47-66.
- [8] 任斐, 周永, 严文, 等. 支气管肺泡灌洗液 RNA 恒温扩增检测涂阴肺结核的诊断价值. 临床肺科杂志, 2015, 20(11): 1968-1972.
- [9] 沙巍, 何娅, 蒋瑞华, 等. 实时荧光核酸恒温放大检测(SAT)法对肺结核诊断价值的研究. 中国防痨杂志, 2012, 34(6): 377-379.
- [10] Cui Z, Wang Y, Fang L, et al. Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect *Mycobacterium Tuberculosis* complex. J Clin Microbiol, 2012, 50(3): 646-650.
- [11] 蔡杏珊, 马品云, 张院良, 等. 实时荧光核酸恒温扩增检测技术在结核病诊断中的临床应用. 中国防痨杂志, 2014, 36(6): 458-461.
- [12] 范琳, 王鹏, 杨妍, 等. RNA 恒温扩增实时荧光检测技术检测支气管肺泡灌洗液对涂阴肺结核的快速诊断价值. 中国防痨杂志, 2015, 37(2): 140-144.

(收稿日期: 2016-07-13)

(本文编辑: 孟莉 范永德)